#### (19) 世界知的所有権機関 国際事務局



# - | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 | 1888 |

(43) 国際公開日 2005 年9 月15 日 (15.09.2005)

**PCT** 

### (10) 国際公開番号 WO 2005/085416 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: 15/54, C12Q 1/18, G01N 33/15, 33/50 C12N 1/19,

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2005/004272

(22) 国際出願日:

2005年3月4日(04.03.2005)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2004-061273 2004 年3 月4 日 (04.03.2004) J

- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 工藤 俊章(KUDO, Toshiaki) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2番 1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 本山 高幸 (MOTOYAMA, Takayuki) [JP/JP]; 〒3510198 埼 玉県和光市広沢 2番 1号 独立行政法人理化学研究 所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔 , 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒 1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目3番20号 神谷町MT ビル19階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される 各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語 のガイダンスノート」を参照。

- (54) Title: METHOD OF SCREENING FUNGUS-SPECIFIC ANTIMICROBIAL AGENT AND KIT THEREFOR
- (54) 発明の名称: 糸状菌特異的抗菌剤のスクリーニング方法及びそのためのキット
- (57) Abstract: It is intended to provide a method of efficiently screening a candidate for a pesticide or a candidate for a medicine. More specifically speaking, it is intended to efficiently screen without using a plant, in the case of a pesticide, a pesticide candidate showing no undesirable effect on other organisms including plants. The above object has been established by successfully developing a screening method which comprises transforming, with a gene expression vector encoding a fungi-specific enzyme, a yeast which is biologically analogous to fungi but does not have the above enzyme, applying pesticide candidate samples to a control yeast (i.e., a yeast not expressing the fungus-specific enzyme) and the transformant expressing the fungus-specific enzyme, and selecting a pesticide candidate sample which exerts a growth inhibitory effect or a fungicidal effect specifically on the transformant expressing the fungus-specific enzyme while showing no effect (i.e., side effects, etc.) on the control yeast as a candidate for pesticide. Similarly, this screening method is also applicable to the screening of a medicine candidate.
- (57)要約: 本願発明は、農薬候補又は医薬候補の効率的なスクリーニング方法を提供することを課題としている。具体的には、農薬については、植物体を用いることなく、しかも、植物など他の生物に弊害を及ぼすことのない農薬候補化合物を、効率的にスクリーニングすることを課題としている。 本願発明者等は、糸状菌特異的酵素をコードする遺伝子発現ベクターで糸状菌と生物学的に近縁であるが当該酵素を有しない酵母を形質転換し、農薬候補試料をコントロール酵母(糸状菌特異的酵素を発現しない酵母)及び糸状菌特異的酵素発現形質転換体に適用し、コントロール酵母に副作用などの影響を与えず、糸状菌特異的酵素発現形質転換体のみに特異的に成長阻害又は殺菌作用を示す農薬候補試料を、農薬候補として選択するスクリーニング方法を開発することに成功し、本願発しまのでできる。



#### 明細書

糸状菌特異的抗菌剤のスクリーニング方法及びそのためのキット

### 技術分野

本願発明は、糸状菌特異的抗菌剤、例えば、糸状菌特異的農薬又は抗糸状菌医薬の新たなスクリーニング法に関する。より具体的には、本願発明は、糸状菌特異的酵素をターゲットとした薬剤をスクリーニングする方法に関する。

#### 背景技術

従来からの、農薬として有用な物質の探索を目的として行われる試験としては、 実験室内での培地上で一次試験とすることが通常である。培地上での標的病害菌 に対するこのような試験では、標的病害菌に対して効果がある様々な薬剤が全て 引っかかってくる。そのため、非ターゲット生物に対しても殺菌性を示してしま う薬剤を拾ってしまう可能性が高い。

他方、作物体の一部又は温室内での植木鉢を用いた病害防除試験は、作物の育成、調製が欠かせず、費用及び労力を要するところ、現在新機能薬となる化合物は、供試化合物の1万分の1程度といわれており(非特許文献1;)、非常に多数の供試化合物の検査には、不適切であった。

さらに、このような方法では、植物体、人体への副作用などについては、十分 検討できないものであった。

たとえば、有機水銀剤は、イネいもち病の重要な防除剤として使用されてきたが、動物への毒性に鑑み、使用が中断されている。

また、農薬の植物毒性を簡便に調査する方法としては、植物培養細胞を用いる方法が提案されている(特許文献1:特開平5-294995)。さらに、特許文献2 (特開平9-124411)では、いもち病害防除剤のためのファイアトレキシンのスクリーニングを、試験試料をイネの葉先端に滴下施用後、1週間後に、葉を裁断し抽出してファイアトレキシンの生成の有無をHPLCで確認する方法が記載されている。

一方、各種糸状菌病に有効な農薬として知られているフェニルピロール phenylpyrroles、ジカルボキシイミド dicarboximides、芳香族炭化水素 aromatic hydrocarbons の薬剤の作用点の解析から(非特許文献 2 - 7:Pillonel and Meyer, 1997; Zhang et al., 1999; Fujimura et al., 2000; Ochiai et al., 2001; Ochiai et al., 2002; Oshima et al., 2002)、多くの糸状菌特異的農薬のターゲットが 糸状菌特異的ヒスチジンキナーゼ(ここでは 0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼ と呼ぶ)であることが解明されつつある。本願明細書中では 0s-1 ファミリーヒス チジンキナーゼ(Os-1ファミリーとも表記する。Os-1サブファミリーとも表記 された。)は、菌糸型生長を行う菌類(糸状菌)由来の、ヒスチジンキナーゼドメ インとレスポンスレギュレータードメインを持つハイブリッド型ヒスチジンキナ ーゼであって、アカパンカビのハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ 0s-1 (配列番 号 17; Nik-1 とも言う; 非特許文献 8: Alex et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA93:3416-3421) に存在するお互いに相同性を示す6つのアミノ酸リピート (アミノ酸リピート1 (171-260, 90 aa)、アミノ酸リピート 2 (261-352, 92 aa)、 アミノ酸リピート3 (353-444, 92 aa)、アミノ酸リピート4 (445-536, 92 aa)、 アミノ酸リピート 5 (537-628, 92 aa)、アミノ酸リピート 6 (629-700, 72 aa)) を含む領域の全長と50%以上の相同性を示す領域を有するものを意味する。

医薬のスクリーニングについても同様の問題が存在している。

特許文献 1 特開平 5 - 2 9 4 9 9 5

特許文献 2 特開平 9 - 1 2 4 4 1 1

非特許文献 1 植物病理学事典 養賢堂 1995年3月30日、P.783 -784

非特許文献 2 Pillonel, C., and Meyer, T. 1997. Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of Neurospora crassa. Pestic. Sci. 49: 229-236

非特許文献 3 Ochiai, N., Fujimura, M., Oshima, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Yamada-Okabe, H. and Yamaguchi, I. 2002. Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in Candida

albicans. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 2209-2215.

非特許文献 4 Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Xu, J.-R., and Lam, S. 1999. The hyper-osmotic stress response pathway of Neurospora crassais the target of phenylpyrrole fungicides. Proc. 20th Fungal Genetics Conference, Asilomar, USA, p. 72

非特許文献 5 Fujimura, M., Ochiai, N., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., and Yamaguchi, I. 2000. Sensitivity to phenylpyrrole fungicides and abnormal glycerol accumulation in os and cut mutant strains of Neurospora crassa. J. Pestic. Sci. 25: 31-36

非特許文献 6 Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., and Yamaguchi, I. 2001. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of Neurospora crassa. Pest Manag. Sci. 57:437-442.

非特許文献 7 Oshima, M., Fujimura, M., Banno, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A., and Yamaguchi, I. 2002. A point mutation in the two-component histidine kinase BcOS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of Botrytis cinerea. Phytopathology, 92, 75-80.

非特許文献 8 Alex et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 3416-3421

#### 発明の開示

本願発明は、農薬候補又は医薬候補の効率的なスクリーニング方法を提供することを課題としている。具体的には、農薬については、植物体を用いることなく、しかも、植物など他の生物に弊害を及ぼすことのない農薬候補化合物を、効率的にスクリーニングすることを課題としている。

本願発明者等は、植物病害を起こす病害菌に特異的に作用する農薬をスクリーニングする方法を鋭意研究した結果、植物病害菌にのみ存在する酵素又は該酵素が関与する情報伝達経路を標的とする農薬候補をスクリーニングすることで、植物病害菌を特異的に抑え、他の生物に影響をしない、農薬を探査できると考えた。

そこで、糸状菌防除を例とし、糸状菌にのみ存在する酵素又は酵素を介する情報伝達系を利用できないか検討した。上述したように、糸状菌を防除するための農薬である三種のグループ(フェニルピロール phenylpyrroles、ジカルボキシイミド dicarboximides、芳香族炭化水素 aromatic hydrocarbons)(図 1)の薬剤の作用点の解析から、フェニルピロールに属するフルジオキソニルをはじめとする多くの糸状菌特異的農薬のターゲットが糸状菌特異的ヒスチジンキナーゼ(0s-1ファミリー)を介した情報伝達系であることが明らかになりつつある。本発明者らは、まず、この情報伝達系を利用し、農薬候補スクリーニング方法及びキットを開発した。

具体的には、本願発明者等は、これら糸状菌特異的酵素をコードする遺伝子発現ベクターで糸状菌と生物学的に近縁であるが当該酵素を有しない酵母を形質転換し、農薬候補試料をコントロール酵母(糸状菌特異的酵素を発現しない酵母)及び糸状菌特異的酵素発現形質転換体に適用し、コントロール酵母に副作用などの影響を与えず、糸状菌特異的酵素発現形質転換体のみに特異的に成長阻害又は殺菌作用を示す農薬候補試料を、農薬候補として選択するスクリーニング方法を開発することに成功し、本願発明を完成させたものである。

なお、本スクリーニング方法は、医薬候補のスクリーニングにも同様に用いる ことができる。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2004-061273 号の明細書 および/または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、糸状菌を標的とした三種のグループの薬剤:薬剤の構造と、その薬剤が病原糸状菌防除に用いられる生物を示す。

図2は、バクテリア及び真核生物のヒスチジンキナーゼの概念図。

図3は、0s-1ファミリーのヒスチジンキナーゼ及び出芽酵母のヒスチジンキナーゼの概念図。

図4は、糸状菌と出芽酵母の情報伝達系の比較 出芽酵母とアカパンカビで 共通と推定される部分を網掛けした。アカパンカビのタンパク質で括弧に入って

いるのは酵母のタンパク質と相同性はあるが相補性が確認されていないものである。

図 5 は、イネいもち病菌の HIK1 を導入した出芽酵母の薬剤感受性試験結果: A. HIK1 を GAL1 プロモーターの制御下で発現させることができるプラスミドを酵母に導入して、発現誘導条件で各種薬剤への感受性をみた。: B. 各種薬剤を含む 90mm 径プレート上に、プレートの上段には pYES2-HIK1 を導入した酵母細胞懸濁液、下段には pYES2 を導入した酵母細胞(コントロール)、それぞれを 9mm 間隔で (左から  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ /ml)  $5\mu$ l ずつ滴下後  $30^\circ$  C で 60 時間培養した。左プレートより、プレートごとに、S G培地のみ、Fludioxonil, Iprodine, Chloroneb, 又は Cycloheximide が添加されている。薬剤濃度は、Fludioxonil, Iprodine, 及び Chloroneb については、最上段のプレートが 5ppm、2 段目のプレートが 25ppm,更に、 100ppm である。 Cycloheximide については、100ppm で 100ppm 100ppm で 100ppm で 100ppm で 100ppm で 100ppm で 100ppm 100ppm 100ppm で 100ppm 100pp

図 6 は、HIK1 による薬剤感受性とヒスチジンキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインの有無:A. ヒスチジンキナーゼドメインが機能しない Hik1-H736V あるいはレスポンスレギュレータードメインが機能しない Hik1-D1153E を発現する酵母を作成した。: B. 各種薬剤を含む 90mm 径プレート上に、最上段には pYES2 を導入した酵母細胞懸濁液、上から 2 段目には pYES2 ー HIK1 を導入した酵母細胞懸濁液、上から 3 段目には pYES2 ー hik1 ー H736V を導入した酵母細胞懸濁液、最下段には pYES2 ー hik1 ー D1153E を導入した酵母細胞懸濁液それぞれを 9mm 間隔で(左から  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ /m1)  $5\mu$ 1 ずつ滴下後  $30^\circ$  C で 72 時間培養した。なお、各プレートには、左のプレートから順に、S G 培地のみ、25ppm Fludioxonil、25ppm Iprodione、50ppm Chloroneb、又は 0.5M NaC1 となるように薬剤が含有されている。

図7は、HIK1による薬剤感受性とSSK1とHOG1の有無: A. ssk1変異株とhog1変異株ではHIK1を導入しても薬剤感受性を示さない。各種薬剤を含む90mm径プレート上に、上段から、順に、(最上段)コントロール酵母にpYES2ーHIK1を導入した細胞懸濁液、(2段目)hog1変異株にpYES2ーHIK1を導入した細胞懸濁液、(3段目)ssk1変異株にpYES2ーHIK1を導入した細胞懸濁液、(4段目)stel1変異株

に pYES2 - HIK1 を導入した細胞懸濁液、(5 段目) コントロール酵母に pYES2 を導 入した細胞懸濁液、(6段目) hog1変異株に pYES2-HIK1 を導入した細胞懸濁液、 (7段目)ssk1 変異株に pYES2-HIK1 を導入した細胞懸濁液、又は(最下段)stel1 変異株に pYES2-HIK1 を導入した細胞懸濁液それぞれを 9mm 間隔で(左から  $10^7$ 、 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>/ml) 5μl ずつ滴下後 30°C で 60 時間 (NaCl のみ 9 6 時間) 培養し た。なお、左のプレートから順に、各プレートには、SG培地のみ、25ppm Fludioxonil、25ppm Iprodione、50ppm Chloroneb、又は 0.5M NaCl となるように 薬剤が含有されている。: B. ssk1 変異株と hog1 変異株にそれぞれ SSK1 と HOG1 を導入するとHIK1存在下で薬剤感受性を示すようになった。各種薬剤を含む90mm 径プレート上に、上段から順に、(最上段) hog1 変異株に pCL △-HOG1 及び pYES2 -HIK1 を導入した細胞懸濁液、(2段目) hog1 変異株に pCL△及び pYES2-HIK1 を導入した細胞懸濁液、(3段目) sskl 変異株に pCLΔ-SSK1 及び pYES2-HIK1 を 導入した細胞懸濁液、又は(最下段)ssk1 変異株に pCL∆及び pYES2−HIK1 を導 入した細胞懸濁液それぞれを 9mm 間隔で(左から 10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>/ml)5μl 滴 下後 30°C で 60 時間 (NaCl のみ 9 6 時間) 培養した。 なお、左のプレートから 順に、各プレートには、SG培地のみ、25ppm Fludioxonil、25ppm Iprodione、 50ppm Chloroneb、又は 0.5M NaCl となるように薬剤が含有されている。

図8は、イネいもち病菌のHik1と出芽酵母のYpd1との相互作用 A. CytoTrap two-hybrid system の概要。ターゲットと餌 (bait) の間で相互作用があると hSos が細胞膜に移行し Ras を活性化して、cdc25H 株が 37°C でも生育できるようになる。ここでは、餌の Ypd1 あるいは Ssk1 にターゲットの Hik1 が「食いつくかどうか」をみた。 B. Hik1 と Ypd1 の相互作用。細胞懸濁液(左から  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ /ml)を  $5\mu1$  滴下後それぞれの温度で 5 日間培養した。

## 発明を実施するための最良の形態

本願発明は、植物又は動物に病害を起こす病原糸状菌に特異的な酵素をコードする遺伝子発現ベクターで当該病害菌と生物学的に近縁であるが当該酵素を有しない他の微生物等の生物を形質転換し、農薬又は医薬の候補試料をコントロール微生物(同じ宿主由来で糸状菌特異的酵素を発現しないものなど)及び糸状菌特

異的酵素発現形質転換体に適用し、コントロール微生物に副作用等の影響を与えず、糸状菌特異的酵素発現形質転換体のみに特異的に成長阻害又は殺菌作用を示す農薬候補又は医薬候補を選択するスクリーニング方法及びそのための形質転換体並びにそのためのキットを包含する。

本願発明が対象とする病害菌には、糸状菌、例えば、植物病について言えばイネいもち病菌が、ヒトなどの動物病について言えば、カンジダ、アスペルギルス、水虫菌(白癬菌)等が包含される。糸状菌病害菌特異的酵素としては、糸状菌特異的ヒスチジンキナーゼ(0s-1ファミリー)が包含される。又、糸状菌を対象とする農薬又は医薬をスクリーニングする場合に置いては、糸状菌特異的酵素遺伝子を導入する宿主微生物としては、酵母、好適には出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)を挙げることができる。

さらに具体的には、本願発明には、糸状菌由来の糸状菌特異的ヒスチジンキナーゼ遺伝子を発現する酵母(発現酵母)と発現しない酵母(非発現酵母)の組み合わせからなるキット、及び当該キットを用いる農薬候補スクリーニング方法が包含される。

「病害菌特異的薬剤とその標的酵素、植物病害を例として」

現在までに、植物病害菌特異的農薬として、糸状菌特異的農薬が知られている。 糸状菌特異的農薬としては、フェニルピロール(phenylpyrroles)としてフルジオ キソニル (Fludioxonil) 及びフェンピクロニル (Fenpiclonil) が、ジカルボキ シイミド (dicarboximides) としてイプロジオン(iprodione) 及びビンクロブリン (vinclozolin)が、並びに芳香族炭化水素 (aromatic hydrocarbons)としてはクロ ロネブ (Chloroneb) 及びPCNBが知られている。

最近の研究により、上記した多くの糸状菌特異的農薬のターゲットが糸状菌特 異的ヒスチジンキナーゼであることが、例えば、上記非特許文献2~7により解 明されてきている。

[ヒスチジンキナーゼ及びその情報伝達系]

細胞内情報伝達には、シグナル蛋白質のセリン、スレオニン、アスパラギン酸、 ヒスチジン及びチロシンの修飾を含む可逆的なリン酸化が関与している。ヒスチ ジンキナーゼは、バクテリアから酵母、糸状菌、植物に存在する情報伝達因子の

1つである。

原核生物では、基本的な情報伝達因子として自己リン酸化ヒスチジンキナーゼ 及びそこからリン酸を受け取り下流に情報を伝えるレスポンスレギュレーターの 二つの成分からなり2成分情報伝達システムである。

真核生物のヒスチジンキナーゼは、ほとんどヒスチジンキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインをともに持つハイブリッド型ヒスチジンキナーゼである(図2)(Ota, I. M., and Varshavsky, A. 1993. Science 262: 566-569.; Urao et al. 1999. Plant Cell 11: 1743-1754.,; Pott et al., 2000 Fungal Genet. Biol. 31: 55-67.; Virginia et al., 2000 Curr. Genet. 37: 364-372.; West and Stock, 2001 Trends Biochem. Sci. 26: 369-376.)。

真核生物型のヒスチジンキナーゼを介する情報伝達系は、ハイブリッド型ヒス チジンキナーゼ、含ヒスチジンリン酸転移タンパク質及びレスポンスレギュレー ターの三成分からなる。

ところでハイブリッド型ヒスチジンキナーゼの一つでアパカンカビから見出された 0s-1 は N-末端側に 92 アミノ酸から 72 アミノ酸のお互いに相同性を持つ繰り返し配列を6つ持つという特徴を持つ(図3)(Alex et al., 1996; Schumacher et al., 1997)。このような特徴を持つハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ(Os-1ファミリー)はイネいもち病菌(Pyricularia oryzae:完全世代名 Magnaporthe grisea)や Aspergillus nidulans 等の菌糸型生長を示す菌類(糸状菌)からしか見つかっていない(Alex et al., 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 3416-3421.; Schumacher et al., 1997 Curr. Microbiol. 34: 340-347.; Alex et al., 1998 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7069-7073.; Nagahashi et al., 1998 Microbiology 144: 425-432.)。

[糸状菌特異的薬剤感受性酵母の調製]

0s-1ファミリーは、糸状菌でしか見つかっておらず、しかも、0s-1ファミリーが糸状菌特異的薬剤の対象酵素であると考えられている。他方、糸状菌と同じく真核微生物である酵母においては、生物学的に近縁であるにもかかわらず、0s-1ファミリーは存在しない。例えば、S. cerevisiae においては全ゲノム配列が決定されているが、ヒスチジンキナーゼは一つしか存在せず、0s-1ファミリーの

ものとは異なる特徴を持つもの(Sln1, 図3参照)である(Sln1は、N末端側の6つのアミノ酸リピートを持たず、2つの膜貫通領域を持つ)。しかしながら、興味深いことに、糸状菌の0s-1ファミリーの情報伝達系の下流因子は、出芽酵母Saccharomyces cerevisiaeでも多くが共通している(図4)(Maeda et al., 1995 Science 269: 554-558; Posas et al., 1996 Cell 86: 865-875.; Fujimura et al., 2003 Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 186-191 (2003).)。

そこで、0s-1 ファミリーに属するタンパク質の遺伝子を 0s-1 ファミリータンパク質の遺伝子を有しない酵母に導入して、糸状菌特異的薬剤感受性酵母を調製した。

0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼとしては、菌糸型生長をする菌類(糸状菌)由来の、ヒスチジンキナーゼドメインと、レスポンスレギュレータードメインを持つハイブリッド型ヒスチジンキナーゼであって、アカパンカビのハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ 0s-1(配列番号 17)に存在するお互いに相同性を示す 6つのアミノ酸リピート(アミノ酸リピート1(171-260,90 aa)、アミノ酸リピート2(261-352,92 aa)、アミノ酸リピート3(353-444,92 aa)、アミノ酸リピート4(445-536,92 aa)、アミノ酸リピート5(537-628,92 aa)、アミノ酸リピート6(629-700,72 aa))を含む領域の全長と50%以上の相同性を示す領域を有するものがあげられる。

具体的には、0s-1ファミリーに属するタンパク質としては、例えば、イネいもち病菌の 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ Hikl (DDBJ/EMBL/GenBank accession number AB041647-1)、アカパンカビの 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ Nik-1/0s-1 (Proc. Natl. Acd. Sci. vol. 93, pp. 3416-3421、accession number U50263-1)、Gibberella moniliformisの Nikl (accession number AY456038-1)、Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea)の Bosl (Phytpathology, 92, 75-80、accession number AF435964-1)、Nectria haematococcaの Fik (accession number U61838-1)、Emericella nidulans (Aspergillus nidulans)の Hk4 (accession number AY282750-1)、Cochliobolus heterostrophusの Bmhk1 (accession number AB095748-1)、Alternaria brassicicolaの AbNIK1p(accession number AY700092-1)、カンジダ酵母 Candida albicansの CaNIK1 (accession number AB006363-1)、

Yarrowia lipolytica の CaNIK1 類似タンパク質(accession number CR382131-129)、Cryptococcus neoformans の推定ヒスチジンキナーゼ (accession number AE017343-338) を挙げることができる。

さらに、これら 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子のコードするアミノ酸配列で表されるペプチド又は該アミノ酸配列に対して、いくつかのアミノ酸が欠失、置換、及び/又は付加されたアミノ酸配列で表されるペプチドであってヒスチジンキナーゼ活性(ヒスチジンキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインが機能している)を有するポリペプチドをコードする遺伝子も含めることができる。ここで、いくつかのアミノ酸とは、1 から 200 アミノ酸、好適には、1 から 100 アミノ酸、さらに好適には、1 から 50 アミノ酸、より好適には、1 から 20 アミノ酸、さらに好適には 1 から 9 アミノ酸を意味する。

また、これら 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子は、上記した os-1ファミリー遺伝子に対して、通常のデフォルト条件で比較し、80%以上の相同性、好適には、85%以上の相同性、さらに好適には、90%の相同性、より好適には、95%以上の相同性を有するヒスチジンキナーゼ活性(ヒスチジンキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインが機能している)を有するポリペプチドをコードする遺伝子も含めることができる。

好適には、イネいもち病菌由来の HIK1 及び配列番号 16 で示されるアミノ酸配列で表されるペプチド又は配列番号 16 で示されるアミノ酸配列に対して、1 乃至数個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は付加されたアミノ酸配列で表されるペプチドであってヒスチジンキナーゼ活性(ヒスチジンキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインが機能している)を有するポリペプチドをコードする遺伝子を挙げることができる。

これら 0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子を導入する生物体としては、微生物、植物培養細胞が挙げられ、好適には、0s-1 の下流の情報伝達系(含ヒスチジンリン酸 転移 タンパク質、レスポンスレギュレーター、MAPKKK, MAPKIN MAPkinase からなる情報伝達系)を備えた生物体が望ましい。具体的には、含ヒスチジンリン酸転移タンパク質として Ypd1、レスポンスレギュレーターとして Ssk1、MAP kinase として Hog1 を内生的に有する微生物、好適には酵

- 10 -

母、特に好適には出芽酵母、サッカロミセス属に属する微生物を挙げることができる。

Os-1ファミリーに属する遺伝子、例えば H1K1 は、該遺伝子を導入する対象生物における、周知の発現ベクターに組み換えて、当該対象生物に導入することができる。例えば、酵母に導入するのであれば、pYES2、pYEp51、YEp62、pBM150、pLGDSD5、pAM82、pYE4、pAAh5、pMA56、pAH9/10/21、pMA230、pMA91、pG-1/2 等を用いることができる。

組み換えベクターの宿主生物(対象生物)への導入方法としては周知の手段を用いることができるが、例えば、酵母の形質転換は酢酸リチウム法(Ito et al., 1983 J Bacteriol. 153:163-168.)を用いることができる。

[スクリーニング方法及びそのためのキット]

- [I] 本発明の農薬候補又は医薬候補化合物スクリーング用キットとしては、
- (1)0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子などの糸状菌特異的遺伝子発現ベクターで酵母などの宿主生物を形質転換して調製された形質転換体および同じ宿主で糸状菌特異的遺伝子を発現しないコントロール生物を含むキット、好適には、
- (2)(1) 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現ベクターで酵母を形質転換して調製された形質転換体および宿主酵母をベクターのみで形質転換して作成したコントロール酵母を含むキットが挙げられる。

上記キットには、更に、以下で説明するスクリーニングに用いる計測用試薬などを含めることができる。

- [II] 本発明の農薬候補又は医薬候補化合物スクリーング方法は、
- (1)0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子などの糸状菌特異的遺伝子発現ベクターで酵母などの宿主生物を形質転換して調製された形質転換体および同じ宿主で糸状菌特異的遺伝子を発現しないコントロール生物に農薬候補試料又は医薬候補試料を投与する工程
- (2) 農薬候補試料又は医薬候補試料を投与された上記糸状菌特異的遺伝子発現 形質転換体及びコントロール生物を一定時間培養する工程、及び
  - (3) 一定時間培養後、糸状菌特異的遺伝子発現形 質転換体及びコントロール生

物の生存量(又は生存細胞数)を計測する工程を含んでいる。 好適には、

- (1)0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現ベクターで酵母を形質転換して調製された形質転換体および宿主生物をベクターのみで形質転換して作成したコントロール酵母に農薬候補試料を投与する工程
- (2) 農薬候補試料を投与された上記 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝 子発現形質転換体及びコントロール酵母を一定時間培養する工程、及び
- (3)一定時間培養後、0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現形質転換体及びコントロール酵母の増殖(又は生存細胞数)を計測する工程を含んでいる。

以下具体的には、酵母を形質転換して用いる場合を例示して説明するが、他の 微生物又は生物体であっても同様にスクリーニングなし得る。

0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現形質転換酵母とコントロール 酵母の増殖又は生存細胞数は、例えば、目視や、OD<sub>600</sub>を測定することにより計測 することもできるが、これ以外にも、酵母の酸素消費量を計測、培地中の糖濃度 減少を計測する、蛍光又は発色酵素などの標識により酵母特異的標識抗体、又は ビオチン等ラベルされた酵母特異的抗体を用いて計測する等、周知の適宜の方法 で計測することができる。

#### (i) プレート法

0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現ベクターで形質転換した形質転換体とコントロール酵母を適当な細胞数、例えば、 $10^7$  細胞/ml、 $10^6$  細胞/ml、 $10^6$  細胞/ml、及び  $10^4$  細胞/ml となるように希釈し、1 定量の農薬候補試料を含むプレート(例えば、90mmプレート)に、同じ量の細胞含有溶液(例えば、5  $\mu$  リットル)を滴下し、適宜な時間、例えば、5 時間以上、3 0 0 時間以下、好適には、48 から 72 時間、培養温度は  $25^\circ$  C- $37^\circ$  C、好適には、3 0  $\circ$  で培養し、プレートにおける 0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現形質転換酵母とコントロール酵母の増殖状況を目視により確認し、コントロール酵母と 0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現形質転換体で増殖状況(生存数)が異なった農薬候補試料又は医薬候補試料を、農薬候補又は医薬候補試料を、農薬候補又は医薬候補として選抜する。

#### (ii) 液体培養法

0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現ベクターで形質転換した形質 転換体とコントロール酵母をそれぞれ、8 時間から 10 時間培養した後に、0D<sub>600</sub> を測定する。次に、1 定量の農薬候補試料又は医薬候補試料を含む培地に例えば、 OD<sub>600</sub>=0.01 になるように加える。適温、例えば、27°C で培養、好適には、振と う培養し、160 rpm で旋回振とうし、適宜の時間後から、一定時間間隔、好適に はコントロール酵母の倍加時間の+-50%時間の範囲内の一定時間間隔で OD<sub>600</sub>を計測する。コントロール酵母としてATCC201388にベクターpYES2 を形質転換したものを用いた場合には、例えば、3時間間隔で OD<sub>600</sub>を計測する。 この計測から、増殖曲線を作り、倍化時間を計算する。コントロール酵母に対し、 Os-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現形質転換体で倍加時間に20% 以上、好適には50%以上、更に好適には100以上の倍加時間の増加した農薬 候補試料又は医薬候補試料を、農薬候補又は医薬候補として選抜する。

更に、次のような方法を採用することもできる。

(iii). それぞれの酵母をプレーティングしたプレート上でペーパーディスクにしみこませて薬剤を投与し、30°C程度で静置培養し、目視等により生育阻止部分を評価する。

なお、従来より fludioxonil と iprodione については、アカパンカビ (Ochiai et al., 2001. Pest Manag Sci. 57:437-442.) とイネいもち病菌以外にも、カンジダ症の病原菌 Candida albicans (Ochiai et al., 2002. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 2209-2215.)、Alternaria alternata (Dry et al., 2004. Fungal Genet Biol. 41:102-108.) においては 0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼがターゲットであることが示唆されている。同様に、ある糸状菌由来の 0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼを標的として上記方法でスクリーニングされた農薬候補又は医薬候補は、通常、0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼを有する他の糸状菌に対しても、農薬又は医薬候補として検討対象とすることができる。

## 材料

使用した酵母菌株とプラスミドを以下の表1に示す。

表 1

表1 菌株とプラスミド

	genotype	origin
S. cerevisiae strain		
ATCC201388	$MAT$ a his $3\Delta1$ leu $2\Delta0$ met $15\Delta0$ ura $3\Delta0$	ATCC*
ATCC4002724	$hog I\Delta$ of ATCC201388	ATCC
ATCC4001561	ssk1∆ of ATCC201388	ATCC
ATCC4005271	ste 11 $\Delta$ of ATCC201388	ATCC
ATCC4000993	$slt2\Delta$ of ATCC201388	ATCC
cdc25H	MATa ade2-101 his3-200 leu2-3 112 lys2-801 trp1-901	Stratagene
	ura3-52 cdc25-2 Gal*	
plasmid		
pYES2	2μm URA3	Invitrogen
pYES2-HIK1	HIKI in pYES2	this study
pYES2-hik1-H736V	hik1-H736V in pYES2	this study
pYES2-hik1-D1153E	hik1-D1153E in pYES2	this study
pCLΔ	CEN LEU2	this study
pCLΔ-SSK1	SSKI in pCLA	this study
pCLΔ-HOG1	HOG1 in pCLΔ	this study
pSos	2μm <i>LEU</i> 2	Stratagene
pSos-SSK1	SSK1 in pSos	this study
pSos-YPD1	YPD1 in pSos	this study
pMyr	2μm URA3	Stratagene
рМуг-НІК1	HIK1 in pMyr	this study

<sup>\*</sup>ATCC, American type culture collection

薬剤は和光純薬から入手した。培地成分は特に断らない限り Difco から購入したものを用いた。なお、遺伝子操作は一般的方法を用いた (Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.)。酵母の培養は特に断らない限り30°Cで行った。完全培地はYPD (1% yeast extract、2% peptone、2% glucose)を用い、最小培地は選択に必要な栄養源を抜いたSD (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids、2% glucose、1X dropout solution(Clontech))あるいはSG (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids、2% galactose、1% raffinose、1X dropout solution (Clontech)) を用いた。プレートを作る場合は2%になるように寒天を

加えた。イネいもち病菌 P-2 株の cDNA は以前報告した (Motoyama et al., 1998 Biosci. Biotech. Biochem. 62: 564-566.) のと同様にして作成した。

### [実施例1]酵母での糸状菌のヒスチジンキナーゼの発現と解析

(1) イネいもち病菌の Os-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子 HIK1 (DDBJ/EMBL/GenBank accession number ABO41647; 西2列番号1)の cDNA を酵母用発現ベクターpYES2の BamHI 部位に挿入し、pYES2-HIK1 を得た。pYES2-HIK1 はGAL1 promoter の制御下で Hik1 の全長をタグなしで発現できる。GAL1 promoterの発現抑制条件での培養はウラシルを抜いたグルコースを炭素源とした合成培地(SD/-Ura)、発現誘導条件での培養はウラシルを抜いたガラクトースを炭素源とした合成培地(SD/-Ura)で行った。酵母の形質転換は酢酸リチウム法(Ito et al., 1983 ibid)を用いた。

薬剤感受性は、プレート上での培養と液体培養により解析した。プレートでの培養の場合、5ml SD/-Uraで一晩前培養し、集菌し、10ml SG/-Uraで洗浄し、10ml SG/-Uraで8時間から 10 時間培養した後に、 $0D_{600}$  を測定し、 $10^7$  細胞/ml、 $10^6$  細胞/ml、 $10^6$  細胞/ml、 $10^4$  細胞/ml に希釈し、各種薬剤を加えた SG/-Ura プレート上に  $5\mu l$  ずつ滴下し、60 時間から 240 時間培養した。液体培養の場合、5ml SD/-Uraで一晩前培養し、集菌し、10ml SG/-Uraで洗浄し、10ml SG/-Uraで8時間から 10ml 時間培養した後に、 $0D_{600}$  を測定し、各種薬剤を含む SG/-Uraが 50ml 入った 300ml 三角フラスコに  $0D_{600}$ =0.01 になるように加えた。27° C 160ml rpmで旋回振とうし、12、15、18、21、24、33、36、39 時間後にサンプリングし、 $0D_{600}$  を測定し、増殖曲線を作り、倍化時間を計算した。

(結果)

0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子 HIK1 の酵母での発現による薬剤感受性の付与

ゲノム中に 0s-1 ファミリーのヒスチジンキナーゼを持たない出芽酵母 S. cerevisiae に、イネいもち病菌由来の 0s-1 ファミリーのヒスチジンキナーゼ Hik1 を pYES2-HIK1 を導入することにより GAL1 promoter の制御下で発現させた (図 5A)。 GAL1 promoter の発現誘導条件で、薬剤非存在下では pYES2-HIK1 形質 転換体は pYES2 形質転換体と同様の生育を示したが、本来感受性を示さない糸状

菌特異的農薬(フルジオキソニル、イプロジオン、クロロネブ、図 1 参照)の存在下では、pYES2-HIK1 形質転換体のみが生育阻害を示した(図 5B)。フルジオキソニルに対する効果は 5ppm で飽和し、イプロジオンに対する効果は 25ppm で飽和し、クロロネブに対する効果は 50ppm で飽和した。また、pYES2-HIK1 形質転換体でも GAL1 promoter の発現抑制条件下では生育阻害を示さなかった(データ示さず)。なお、このような三種のグループの薬剤とは構造の違うシクロヘキシミドに対してはpYES2-HIK1 形質転換体とpYES2 形質転換体の間で発現誘導条件でも感受性の差は認められなかった。以上のように、pYES2-HIK1 形質転換体で GAL1 promoter の発現誘導条件でのみ特異的に、3種の薬剤に対する感受性が付与されることから、この感受性は導入した HIK1 によって特異的に引き起こされていると考えられる。

同様の実験を液体培養で行った場合(表 2)、pYES2 形質転換体の GAL1 promoter 発現誘導条件では薬剤の有無(0、25ppm フルジオキソニル、25ppm イプロジオン、25ppm クロロネブ) にかかわらず同様の生育速度を示し、倍化時間は 2.2 時間前後になった。pYES2-HIK1 形質転換体では、薬剤の影響を受け、薬剤非存在下では倍化時間が 2.19 時間で pYES2 形質転換体の場合とほとんど変わらなかったが、25ppm フルジオキソニル存在下では 4.25 時間、25ppm イプロジオン存在下では 3.12 時間、25ppm クロロネブ存在下では 2.90 時間、と明らかに生育速度の低下が認められた。

表 2

表2 イネいもち病菌の HIKI に	は出芽酵母に薬剤感受性を付与する
--------------------	------------------

yeast strain	reagent	doubling time*
ATCC201388 [pYES2]	-	$2.17 \pm 0.05$
ATCC201388 [pYES2]	25ppm Fludioxonil	$2.25 \pm 0.06$
ATCC201388 [pYES2]	25ppm Iprodione	$2.12 \pm 0.06$
ATCC201388 [pYES2]	25ppm Chloroneb	$2.17 \pm 0.08$
ATCC201388 [pYES2-HIK1]	-	$2.19 \pm 0.06$
ATCC201388 [pYES2-HIK1]	25ppm Fludioxonil	$4.25 \pm 0.20$
ATCC201388 [pYES2-HIK1]	25ppm Iprodione	$3.12 \pm 0.10$
ATCC201388 [pYES2-HIK1]	25ppm Chloroneb	$2.90 \pm 0.11$

<sup>\*</sup>average ± standard deviation

(2) 変異導入した HIK1 は変異導入用合成 DNA (HK-H736V: 5, -CCTCGCTAACATGTCCGTCGAAATCCGCACACC-3, (配列番号2), HK-D1153E: 5, -GATGTGATCCTGATGGAGGTTCAAATGCCTGTCATG-3, (配列番号3)) を使用し、Mutan-Express Km kit (宝酒造) により作成した。それぞれの変異導入 HIK1 をpYES2 の BamHI 部位にクローニングすることにより、pYES2-hik1-H736V とpYES2-hik1-D1153Eを作成した。

(結果) Hik1による薬剤感受性の付与にヒスチジンキナーゼの機能に必要とされるドメインが関わっているかどうかをみるため、ヒスチジンキナーゼドメインの機能に必要な自己リン酸化される H736 に変異を入れてこのドメインが機能しなくなるようにしたもの (Hik1-H736V) を発現させるためのプラスミド pYES2-hik1-H736Vと、レスポンスレギュレータードメインのリン酸リレーにおいてリン酸を受け取る D1153 に変異を入れてこのドメインが機能しなくなるようにしたもの (Hik1-D1153E) を発現させるためのプラスミド pYES2-hik1-D1153E を作成して同様に ATCC201388 株に導入した(図 6A)。pYES2-HIK1 を導入した株と異なり、pYES2-hik1-H736V 導入株と pYES2-hik1-D1153E 導入株はいずれも、3種の薬剤 (25ppm fludioxonil、25ppm iprodione、50ppm chloroneb) にほとんど感受性を示さなくなり(図 6B)、ヒスチジンキナーゼドメインとレスポンスレギュレータードメインの両方が薬剤感受性の付与に必要とされることが示唆された。なお、pYES2-hik1-H736V 導入株では薬剤の有無にかかわらずやや生育阻害効果が認め

られた。また、浸透圧 $(0.5M\ NaC1)$  感受性には特に変化は認められなかった。 [参考例1] Hikl による薬剤感受性の付与には酵母の $Hog1\ MAPK$  を介する経路が必要である。

(1) 糸状菌において、Os-1ファミリーヒスチジンキナーゼの下流には、出芽 酵母の Hog1 MAP kinase のホモログ(アカパンカビの場合 Os-2 (Zhang et al., 2002 Appl. Environ. Microbiol. 68:532-538.) で、イネいもち病菌の場合 Osm1 (Dixon et al., 1999 Plant Cell 11: 2045-2058.)) を介した情報伝達系が働いている (図 4)。

Hik1 を出芽酵母で発現させて薬剤感受性が付与された結果の解釈として最も可能性が高いのが、Hik1 に薬剤が作用して、出芽酵母のHog1 MAP kinase に至る情報伝達系を攪乱して生育阻害を引き起こすというものである。この可能性を明らかにするため、この情報伝達系の因子の変異株である hog1 変異株と ssk1 変異株と ste11 変異株を用いて、それぞれの変異株に pYES2-HIK1 を導入して、発現を誘導した場合に薬剤感受性を示すかどうかをみた(図 7A)。hog1 変異株と ssk1 変異株では、pYES2-HIK1 を導入して発現を誘導しても、薬剤(25ppm fludioxonil、25ppm iprodione、50ppm chloroneb) に対する感受性を示さなかった。一方、ste11 変異株の場合は野生型株と同様に、pYES2-HIK1 を導入して発現を誘導すると、薬剤(25ppm fludioxonil、25ppm iprodione、50ppm chloroneb) に対する感受性を示した。なお、pYES2 導入株ではいずれの株も薬剤に対する感受性を示さなかったことから、ここでの薬剤感受性は HIK1 特異的であることが示唆される。また、Hik1 の発現は浸透圧(0.5M NaC1)感受性には影響を与えなかった。以上の結果から、Ssk1 と Hog1 が薬剤感受性の付与に必要で、Ste11 は必要でないことが示唆される。

(2) この段階では、hog1 変異株と ssk1 変異株で pYES2-HIK1 を導入して発現を誘導しても、薬剤に対する感受性を示さなかったのは、hog1 変異や ssk1 変異とは関係がない変異のためである可能性が否定できない。そこで、hog1 変異株と ssk1 変異株にそれぞれ、無傷の HOG1 遺伝子及び SSK1 遺伝子を導入した場合に薬剤感受性が回復するかどうか、言い換えると、hog1 変異や ssk1 変異が薬剤感受性を示さなくなった原因であるかどうかを明らかにするための実験を行った(図

7B)

酵母の変異相補用のプラスミド pCLΔ-HOG1 と pCLΔ-SSK1 は、pCL1 (Clontech) を HindIII 消化し自己連結して作成した pCLΔの HindIII 部位に ATCC201388 株由来の HOG1 あるいは SSK1 をクローニングすることにより作成した。HOG1 は 5'-TTTAAGCTTATCGATTGAAGGAAATAAGAGGAATAGC-3'(配列番号9)で増幅し、SSK1 は 5'-TTTAAGCTTGGGTGAGACAGCTATTTAGCAAGTTC-3'(配列番号9)で増幅し、SSK1 は 5'-TTTAAGCTTCCCACTGCTGGATCGACCATTC-3'(配列番号11)で増幅した。なお、増幅した遺伝子に変異が入っていないことを DNA 塩基配列決定により確認した。

hog1 変異株に pCL $\Delta$ -HOG1 を導入し HOG1 遺伝子を発現させた場合、薬剤に対する感受性が回復した。同様に、ssk1 変異株に pCL $\Delta$ -SSK1 を導入し HOG1 遺伝子を発現させた場合も、薬剤に対する感受性が回復した。なお、ベクターのみ (pCL $\Delta$ ) を導入したコントロールでは両変異株とも薬剤感受性の回復は認められなかった。

以上の結果から、Hog1 MAPK を介した情報伝達系の因子の中で、Ssk1 と Hog1 が Hik1による薬剤感受性の付与に必要で、Ste11 は必要でないことが示された。 [参考例2] Hik1と Ypd1の相互作用の解析

CytoTrap XR library construction kit (Stratagene)を用いて、CytoTrap two-hybrid system によるタンパク質間相互作用を解析した。このシステムは、一方のタンパク質をヒト Sos との融合蛋白として発現させるためのベクターpSos と、もう一方のタンパク質をミリスチン酸化シグナルとの融合タンパク質として発現させるためのベクターpMyr と、酵母における Sos ホモログ Cdc25 の遺伝子に温度感受性変異が入った酵母株 cdc25H とからなる。二つのタンパク質の間で相互作用があるとヒト Sos がミリスチン酸修飾部位により膜に移行し、酵母の cdc25変異を相補し、高温(37度)でも生育できるようになる(図 8A)。pMyr-HIK1 はpMyrの SmaI 部位にHIK1 cDNAをクローニングすることにより構築した。pSos-YPD1は SrfI と SalI で消化した pSos に SmaI と XhoI で消化した ATCC201388 株由来のYPD1を連結することにより構築した。pSos-Ssk1は SrfI と SalI で消化した pSos に SmaI と XhoI で消化した Sos に SmaI と XhoI で消化した ATCC201388 株由来の SSK1を連結することにより構築した。YPD1は5、-TTTCCCGGGATATGTCTACTATTCCCTCAGAAATC-3、(配列番号12)と

5'-TTTCTCGAGTTATAGGTTTGTGTTGTAATATTTAGAT-3'(配列番号13)で増幅し、SSK1は5'-TTTCCCGGGATATGCTCAATTCTGCGTTACTGTGG-3'(配列番号14)と5'-TTTCTCGAGTCACAATTCTATTTGAGTGGGCG-3'(配列番号15)で増幅した。なお、増幅した遺伝子に変異が入っていないことをDNA塩基配列決定により確認した。酵母の形質転換から、形質転換酵母の滴下までは、前述の薬剤感受性の解析の場合と同様に行った。ただし、滴下までの培養は全て25°Cで行い、滴下後は25°Cと37°Cで培養した。

(結果)

### Hikl は酵母の Hogl の上流の情報伝達因子 Ypdl と相互作用する

さらに、Hik1の酵母における作用点を明らかにするために、Hik1と酵母側の相互作用因子の候補 Ypd1 や Ssk1 との間の相互作用を yeast two-hybrid system (図 8A、材料と方法参照)で解析した。本システムで用いる S. cerevisiae cdc25H株は CDC25 遺伝子の温度感受性変異により高温 (37°C)では Ras 経路を活性化できないために生育できず、許容温度の 25°C では生育できる。ターゲットをミリスリン酸化シグナルとの融合タンパク質、獲物 (bait)をヒト Sos (酵母の Cdc25のホモログ)との融合タンパク質として発現させる。ターゲットと獲物との間に相互作用があるとミリスリン酸化シグナルによりヒト Sos が細胞膜に移行し、Ras 経路を活性化して 37°C でも cdc25H株が生育でできるようになることにより、相互作用が検出できる。

ここでは獲物を Ypd1 (pSos-YPD1 で発現) と Ssk1 (pSos-SSK1 で発現) にして、ターゲットのイネいもち病菌の Hik1 (pMyr-HIK1 で発現) が結合するかどうかを解析した (図 8B)。許容温度の 25°C では全ての組み合わせで生育が認められた。ただし、相互作用を示す positive control の組み合わせ (pSos-MAFB + pMyr-MAFB) と相互作用を示さない negative control の組み合わせ (pSos-Col1 + pMyr-MAFB) ではやや生育阻害が認められた。37°C では、positive control の組み合わせでは生育が認められ、negative control の組み合わせでは生育が認められず、実験系に問題がないことが示された。Hik1 が相互作用を示したのは Ypd1 であり (pSos-YPD1 + pMyr-HIK1)、Ssk1 とは相互作用を示さなかった (pSos-SSK1 + pMyr-HIK1)。なお、Ypd1 のみでもわずかに 37°C での生育が認められたが

(pSos-YPD1 + pMyr)、これは Ypd1 の通常の酵母内での相互作用の相手である膜結合領域を持つ Sln1 (図 3、4) との相互作用によるものと考えられる。以上の結果から、出芽酵母内において、イネいもち病菌の Hik1 は出芽酵母の Ypd1 を介して薬剤感受性を付与している可能性が高いことが示された。

#### 産業上の利用可能性

本願発明により、従来の方法では不可能であった、糸状菌特異的酵素をターゲットとして糸状菌に特異的に作用する薬剤の候補を選択的に得ることが出来る。 更に本願発明のスクーニング方法及びキットでは、同じ菌類に属し、糸状菌に近縁である酵母をスクリーニングに用いているため、酵母にも作用する(副作用を起こす)薬剤を薬剤候補の選択と同時に除外することも可能であり、農薬及び医薬の開発を大幅に短縮できるという優れた効果を奏するものである。

本願発明は、農薬開発及び医薬開発の技術分野で利用することができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま引用により本明細書にとり入れるものとする。

#### 請求の範囲

1. 糸状菌の 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子で形質転換した酵母。

- 2. 糸状菌の 0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子が、HIK1 遺伝子である請求項1記載の形質転換酵母。
- 3. 酵母が出芽酵母 (Saccharomyces cerevisiae) である請求項1又は2項記載の形質転換酵母。
- 4. (1) 糸状菌由来の 0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子発現ベクターで形質転換した酵母及び(2) コントロール酵母(糸状菌特異的酵素を発現しない酵母)を含む糸状菌特異的農薬候補又は医薬候補スクリーニングキット。
- 5. 糸状菌由来の 0s-1 ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子が HIK1 遺伝子 である請求項 4 記載の糸状菌特異的農薬候補又は医薬候補スクリーニングキット。
- 6. 酵母が出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)である請求項4又は5記載の糸状菌特異的農薬候補又は医薬候補スクリーニングキット。
- 7. 以下の(1)から(3)の工程を含む糸状菌特異的農薬候補又は糸状菌特異的医薬候補のスクリーニング方法。
- (1) 糸状菌由来 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子組み換え発現ベクターにより酵母を形質転換した形質転換体及びコントロール酵母(0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼを発現しない酵母) に農薬候補試料又は医薬候補試料を投与する工程
- (2) 農薬候補試料又は医薬候補試料を投与された上記 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ発現形質転換体及びコントロール酵母を一定時間培養する工程、及び
- (3)一定時間培養後、0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ発現形質転換体及びコントロール酵母の増殖率又は生存細胞数を計測する工程。
- 8. 形質転換体及びコントロール酵母の増殖率又は生存細胞数の計測を、0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ発現形質転換体及びコントロール酵母の培養液の 0D を計測することにより行う請求項7記載の方法。

9. 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ発現形質転換体及びコントロール酵母の増殖率又は生存細胞数の計測を酵母特異的抗体を用いて行う請求項7記載の方法。

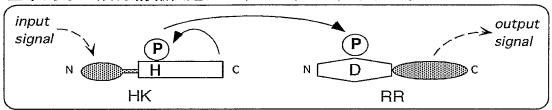
- 10. 糸状菌由来 0s-1ファミリーヒスチジンキナーゼ遺伝子が HIKI 遺伝子である請求項 7から 9 いずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。
- 11. 酵母が出芽酵母 (Sac charomyces cerevisiae) である請求項7から1 0いずれか1項に記載のスクリーニング方法。

# 図 1

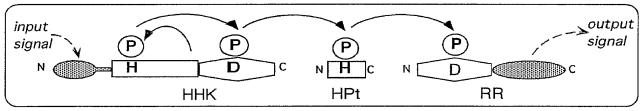
PCT/JP2005/004272 WO 2005/085416

# 図 2

## 基本的な二成分情報伝達システム(バクテリア型)



# ハイブリッド型ヒスチジンキナーゼを利用した二成分情報伝達システム (真核生物型)



- histidine kinase domain (HKD) H
- p response regulator domain (RRD)
- effector domain

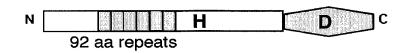
HK: histidine kinase

RR: response regulator HHK: hybrid-type histidine kinase

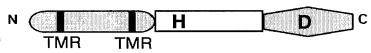
HPt: histidine containing phospho-transfer protein

図3

Os-1ファミリーの ヒスチジンキナーゼ



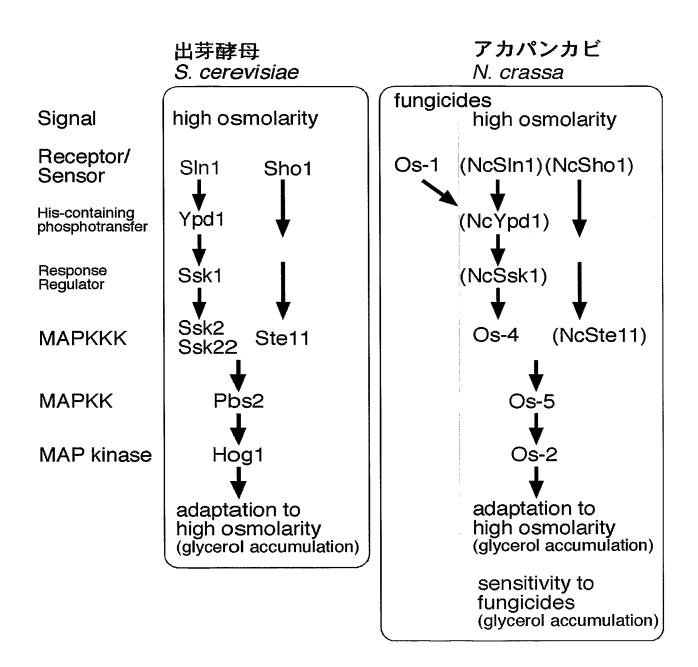
出芽酵母の N Lスチジンキナーゼ (SIn1) TMR

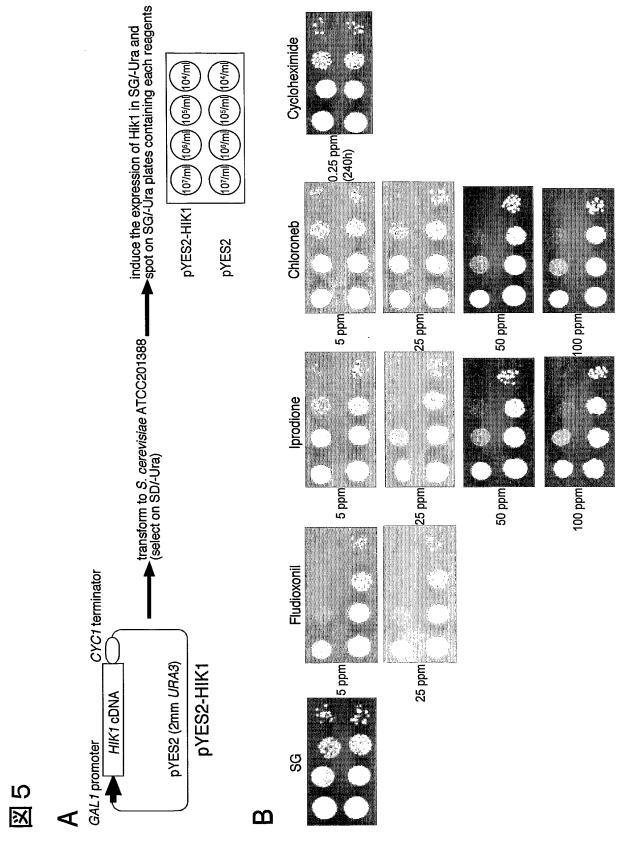


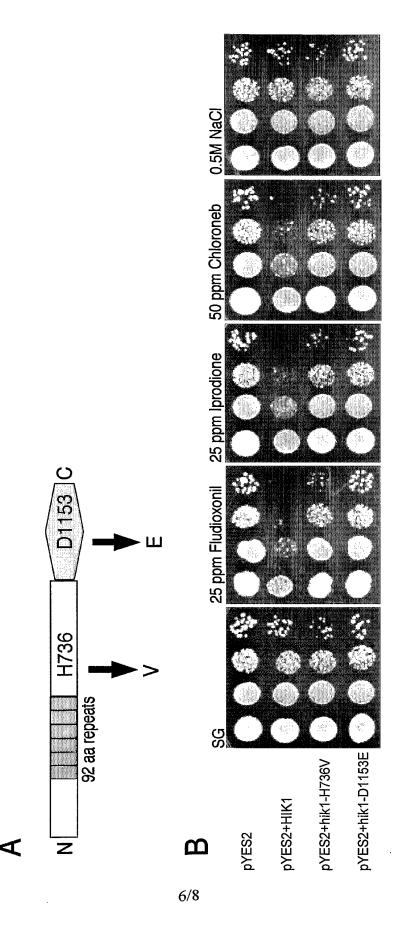
histidine kinase domain
response regulator domain

TMR: transmembrane region

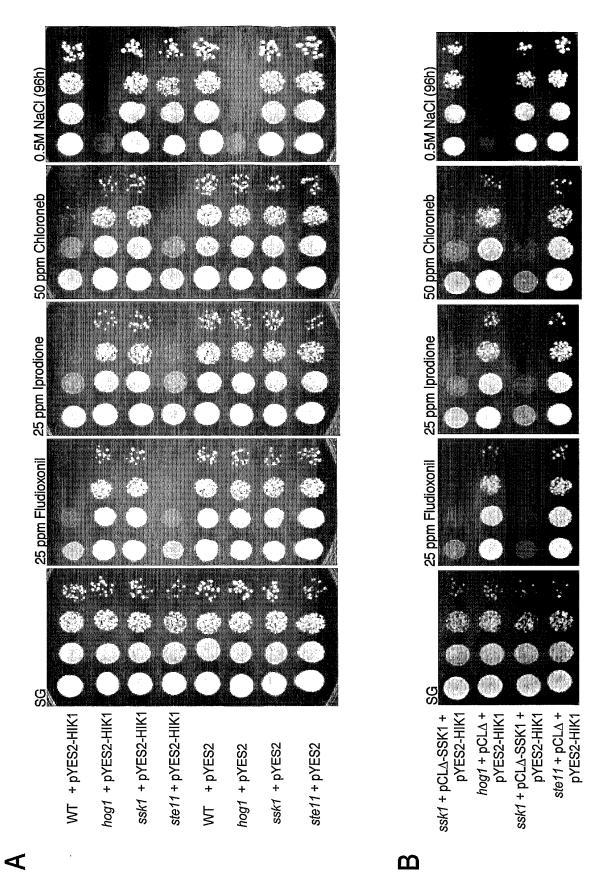
# 図 4





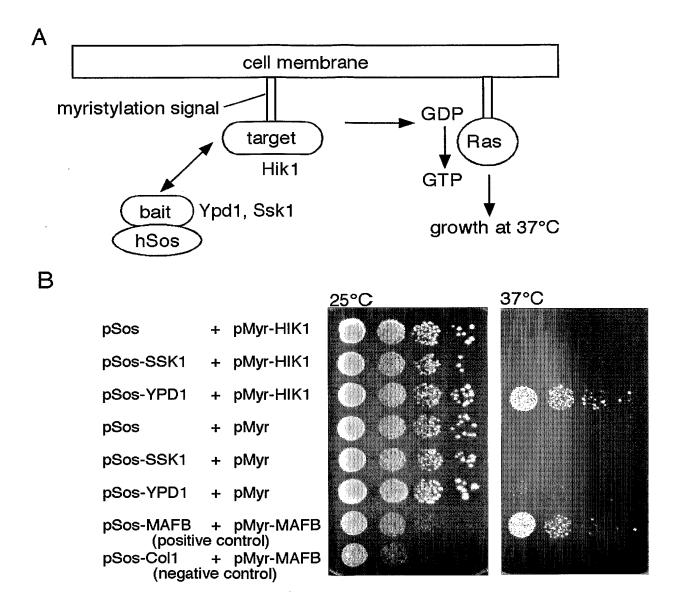


<u>図</u>



**図** 

# 図8



#### SEQUENCE LISTING

<110> Method for screening of filamentous fungus-specific antimicrobial agents and kit for the screening

<120> RIKEN

<130> PH-2421-PCT

<150> JP 2004-061273

<151> 2004-03-04

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5457

<212> DNA

<213> Magnaporthe grisea

#### <400> 1

taattttca teecetegt gtegeetteg egeetaetta eegaettaee geettetege 60
tgattgagee aeggaggge aattgggett gggggegeta ttttttattt tettattaet 120
attettttt tttgaatett taeeaacett eettggetgg tttaetteet egtettaea 180
etgeaacagt ageaegeeat eegaeeageg acaacaatet eeaaeeetee eeaggeeae 240
eeaateaace aacaagettg gtteteeaeg aecaeageaa teetttgatt eeetggegg 300
eeegetaaee teatgaatte etaageegae etggateaat eeaaegeetg etteggtgt 360
tagggeaget geegaetttt ttttettet aeatatata ttteaaateg teetatatt 420
gaeegtegge egagtteega eaeeegeeae gegeateatg geggaeegeg egaetetgge 480

agctgtcgct gcgattgtgg agaatatcgc taccaactcg ggggcccctg gaaaaaatgc 540 ttcatttcgc tccagtacct atgtccagct tcccggtccg gaatccgacg agaagaaaca 600 gctcgagcgc gagcttgccg ccctggtgat aagggtacag cagctcgaaa cccgtgccaa 660 cgcggctcct gctacaatat tccccgacac acccaacgaa actgcacatt cactctttgg 720 cgatgatage tegtececta ceagttegag etcaggeegg gageetaaae gaetgaagte 780 ggcatccagc acaacgagga atggtttcac tacggacggt cgtccatcaa agctcaacgc 840 aatcaccgat gaggagctcg aaggettgcg cgaacatgtt gacggccagt cccggctgct 900 cgacagccaa agggccgagc tggacggcgt caatgcccaa ctcttggagc agaagcagct 960 gcaagagcgc gcccttgcca taatcgagca ggaacgtgta gccactttgg agagagagct 1020 atggaaacat caaaaggcca acgaggcctt ccagaaggct ctccgggaga ttggatcgat 1080 agtgaccgct gcagcccggg gtgacctctc taagagggtc aagataaacc cgattgagat 1140 ggaccctgaa atcaccacat tcaagaggac catgaacgcc atgatggatc aacttggcgt 1200 cttctctagt gaagtctcgc gagtggcaag agaggtcggc accgagggca tattaggtgg 1260 acaggcccag atcgagggag tggacggcac gtggaaagaa ctgacggaca atggtacggt 1320 cgaaacgctg ctcatcacct ctcctatcca taactaccac cgcagatgct aacattgata 1380 ctttcataca gtcaacgtca tggcgcagaa cctgaccgac caagtccgcg aaatcgcctc 1440 agtcactaca gctgtggccc acggagattt gacccaaaag attgagagtg cggccaaggg 1500 agaaatccta cagcttcaac aaactataaa taccatggtg gaccaactac gcacatttgc 1560 ttcagaggtt acccgtgtcg cccgtgacgt cggaaccgag ggaatgctcg gcgggcaggc 1620 tgacgttgaa ggggtcaagg gcatgtggaa tgagctgacg gtcaacgtca acgccatggc 1680 caacaattta acaacccaag tgcgcgacat catcaacgtt accacagccg tcgcaaaggg 1740 agatettaea caaaaggtge aggeggaatg tegeggegag atttttgage teaagaacae 1800 gatcaattcc atggtggacc agctgcagca atttgctcgc gaggttacca agatcgccag 1860 agaggttggt accgaaggac ggctgggcgg ccaagcaact gttcacgatg tacagggaac 1920 ttggcgagat ctcacagaaa acgtgaacgg aatggctatg aatctcacca cacaagtacg 1980 agagatagcc aatgttacca gtgccgtcgc tgcaggcgac ctatccaaga agatcagggt 2040 agaggtcaag ggcgagattc tggacctcaa aaataccatc aacaccatgg ttgaccgcct 2100 cggaactttc gccttcgaag tcagcaaagt agcccgagcc gtcggcacag atggcactct 2160 tggtggtcag gctcaagttg agaatgtgga gggcaaatgg aaagacctca ccgaaaacgt 2220 caacaccatg gcgtcaaacc tcacttctca ggtaagcgga ccttatccac tggattggac 2280

tggtggcttt tcctctgaat tcagccctat tgtaaatcaa tgtatgcacc agtgtgcatg 2340 ttctgcaggg cctgctgtgt gtgcgtcgcc agctgttttg gagacgctgg gcgcatcccg 2400 gcgtgcgctt gcattttgtc aaccaaattt gtctgcacat tgatgcatag cgagcacgtg 2460 ctaatttttg gccgggtctt ataggtcagg ggaatatcaa ccgtgacaca agccatcgcg 2520 aacggtgaca tgagccgaaa gatcgacgtg gaagccaagg gcgagatact aatcctcaag 2580 gaaactatca acaacatggt tgatcgtctg tcgatattct gcaatgaagt acaacgagtc 2640 gcaaaagatg taggcgttga tggcattatg gggggacaag ccgacgttgc aggtctcaag 2700 gggcgatgga aggagattac caccgatgtc aacaccatgg ccaacaatct tgtaagtgct 2760 ggaagatete aaacaacggg aaactcaage cagtgetaae etaateegca gaeggegcaa 2820 gtacgcgctt tcggagatat aaccaatgcc gctaccgacg gagacttcac caagctggtc 2880 gaggttgagg cgtcgggcga aatggacgaa ctgaagcgca agatcaatca aatggtctac 2940 aateteegag acagtateea aagaaacaeg caagcaagag aageegeaga attggeeaac 3000 aagacgaagt cggagtteet cgetaacatg teecacgaaa teegcacace catgaacggt 3060 atcateggea tgacacaact tactettgat acagatttga egcaatacca aegegaaatg 3120 ctcaacattg tcaacaatct cgccatgagt ctgctcacca ttatcgacga catcctcgat 3180 ctgtcaaaga ttgaggctaa gcggatggtt atcgaggaga ttccatacac gttacgagga 3240 acggtcttca acgcactgaa gactttggcg gtcaaggcga acgacaagtt tttggatctc 3300 acgtaccgtg tggacagete agtteetgae cacgteateg gtgactegtt eegtetgege 3360 cagattatec tgaacetggt tggcaatgec atcaaattea eegageatgg agaggteage 3420 cttactatcc agaagggcaa cgacgtgacg tgcctgccaa acgagtacat gatcgaattt 3480 gtcgtgtcgg acacgggcat aggaattcca acggacaaac tgggtctcat cttcgacaca 3540 ttccagcagg ctgatggatc catgacacgc aagtttggcg gaaccgggct tggtctgtct 3600 atttccaaga ggctcgtcaa cctcatgggc ggtgacgtgt gggtcaagtc acaatacggc 3660 aagggcagct cgttctactt cacttgtcgt gtccgcctcg ccgacgtgga tatctcactc 3720 atcaggaagc agctgaagcc ttacaaggga caccaggtcc tgttcatcga taagggcaag 3780 actggacacg ggcccgaggt ggggcagatg ctcggccagc tgggtttggt gcccatcgtg 3840 ctggaatccg agcaaaatca caccetgacg cgggtgcgcg gcaaggaatg tecetacgae 3900 gtgatagttg tcgactcaat cgacacagcc cggcgcctga gaggaattga cgacttcaag 3960 tatctgccca tcgttctcct ggcgccaact gtccacgtca gcctgaaatc ctgcttggac 4020 ttgggtatta cctcgtatat gacgatgccc tgcaagctca tcgacctcgg caatggtatg 4080

gttcccgctc ttgagaaccg tgccacacca tcactatcag acaacactaa gtcgttcgaa 4140 attctgctgg ccgaggacaa caccgtcaac cagcgcctgg ccgttaagat tcttgaaaag 4200 tacaaccacg ttgtgacggt agtcagcaac ggtgctgaag ctcttgaagc tgtcaaggat 4260 aacaaatacg atgtgatect gatggatgtt caaatgeetg teatggtaag ttgatactee 4320 ctcgtacata ttccatgatc ctccgttccc gacccgccag atagtctcga taagttccaa 4380 tactaatacg ttgcaacatt aatagggtgg atttgaggcg acggcaaaga ttcgtgaata 4440 cgagcgcagc ctgggcacac agaggacacc aatcatcgcg cttaccgctc acgcaatgat 4500 gggcgaccgt gagaagtgta tcgaggccca gatggacgag tacctgtcga agcctctgca 4560 gcagaaccac ttgatacaaa caattctcaa gtgtgcaacg ctgggtggcg ccttgttgga 4620 acaaaatcgt gagcgcgagc ttgaactagc aaggcatgcc gaacacaaag gaggactgtc 4680 tacggacccg gcgagggcat cgtcggtaat gcgtccgcca ctacaccacc gaccggtgac 4740 tacageegag tegetttetg gtggegeega aageeeeteg ttgatggeaa atgaeggega 4800 agatccaata caaagggcac gtagcagtct ctctgaacca ggatgcctat aaggctgaca 4860 gctctggcct cctcgcactt gagggcgagc ctgaacattt gtagcttctc ttacgatcct 4920 tgagcgcata gatcactgct gcctttttgt aacagccagc gcgatgacga tgttttcaac 4980 agoctatact tttacctata ccacaaacgc atacgattat cccggtgtac ttctgtctat 5040 tccctaggag tctgggaggt tacattttgt tctagtcatt aatgggtcga tggccaactg 5100 gttttggcca caacgcatca aaaccaaacc agttctgtca tcactgacct tttgttccat 5160 gtcggtaatg tetteattaa tattgttaet tttgcgggte tgggtetget tttacgatgg 5220 atacateggg ggaacaattt etttettett gttttgttgg atatttgtgg tagtttetag 5280 atatctgtcg aactacggga aggtgtggag agtgcattaa gaggcggcgc agttgttgtg 5340 atcttgacac cccgagatga ccacagtcaa cccaatgaat aacacaaaat atacaactct 5400 ctatgtcagt agaccaaata cgtattcgtt gtgttagtgt ttagcgcaag ggaaacc 5457

<sup>&</sup>lt;210> 2

<sup>&</sup>lt;211> 33

<sup>&</sup>lt;212> DNA

<sup>&</sup>lt;213> Artificial Sequence

<220> <223> Description of Artificial Sequence: <400> 2 33 . cctcgctaac atgtccgtcg aaatccgcac acc ⟨210⟩ 3 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence: <400> 3 gatgtgatcc tgatggaggt tcaaatgcct gtcatg 36 <210> 4 <211> 37 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence: <400> 4

PCT/JP2005/004272

37

WO 2005/085416

tttaagctta tcgattgaag gaaataagag gaatagc

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 5

tttaagcttg ggtgagacag ctatttagca agttc

35

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 6

tttaagcttc ccactgctgg atcgaccatt c

31

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence:	
<400>	7	
tttaa	gcttt agttgccagt caagatttcc c	31
<210>	8	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence:	
<400>	8	
tttaa	gctta tcgattgaag gaaataagag gaatagc	37
<210>		
<211>		
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence:	
<400>	9	

PCT/JP2005/004272

35

WO 2005/085416

tttaagcttg ggtgagacag ctatttagca agttc

<210> 10 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence ⟨220⟩ <223> Description of Artificial Sequence: <400> 10 31 tttaagcttc ccactgctgg atcgaccatt c <210> 11 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> . <223> Description of Artificial Sequence: <400> 11 tttaagcttt agttgccagt caagatttcc c 31 <210> 12 <211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence:	
<400>	12	
tttcc	eggga tatgtctact attccctcag aaatc	35
<210>	13	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence:	
<400>		
tttctc	egagt tataggtttg tgttgtaata tttagat	37
<210>	14	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence:	
<400>	14	

PCT/JP2005/004272

35

WO 2005/085416

tttcccggga tatgctcaat tctgcgttac tgtgg

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:

<400> 15

tttctcgagt cacaattcta tttgagtggg cg

32

<210> 16

<211> 1307

<212> PRT

<213> Magnaporthe grisea

<400> 16

Met Ala Asp Ala Ala Thr Leu Ala Ala Val Ala Ala Ile Val Glu Asn

1 5 10 . 15

Ile Ala Thr Asn Ser Gly Ala Pro Gly Lys Asn Ala Ser Phe Arg Ser
20 25 30

Ser Thr Tyr Val Gln Leu Pro Gly Pro Glu Ser Asp Glu Lys Lys Gln
35 40 45

Leu Glu Arg Glu Leu Ala Ala Leu Val Ile Arg Val Gln Gln Leu Glu
50 55 60

Thr Arg Ala Asn Ala Ala Pro Ala Thr Ile Phe Pro Asp Thr Pro Asn 65 70 75 80

Glu Thr Ala His Ser Leu Phe Gly Asp Asp Ser Ser Ser Pro Thr Ser 85 90 95

Ser Ser Ser Gly Arg Glu Pro Lys Arg Leu Lys Ser Ala Ser Ser Thr

100 105 110

Thr Arg Asn Gly Phe Thr Thr Asp Gly Arg Pro Ser Lys Leu Asn Ala 115 120 125

Ile Thr Asp Glu Glu Leu Glu Gly Leu Arg Glu His Val Asp Gly Gln
130 135 140

Ser Arg Leu Leu Asp Ser Gln Arg Ala Glu Leu Asp Gly Val Asn Ala 145 150 155 160

Gln Leu Clu Gln Cln Lys Gln Leu Gln Glu Arg Ala Leu Ala Ile Ile 165 170 175

Glu Gln Glu Arg Val Ala Thr Leu Glu Arg Glu Leu Trp Lys His Gln
180 185 190

Lys Ala Asn Glu Ala Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile Gly Ser Ile
195 200 205

Val Thr Ala Ala Arg Gly Asp Leu Ser Lys Arg Val Lys Ile Asn 210 215 220

Pro Ile Glu Met Asp Pro Glu Ile Thr Thr Phe Lys Arg Thr Met Asn.
225 230 235 240

Ala Met Met Asp Gln Leu Gly Val Phe Ser Ser Glu Val Ser Arg Val
245 250 255

Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ile 260 265 270

Glu Gly Val Asp Gly Thr Trp Lys Glu Leu Thr Asp Asn Val Asn Val
275 280 285

Met Ala Gln Asn Leu Thr Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Ser Val Thr 290 295 300

Thr Ala Val Ala His Gly Asp Leu Thr Gln Lys Ile Glu Ser Ala Ala 305 310 315 320

Lys Gly Glu Ile Leu Gln Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Met Val Asp 325 330 335

Gln Leu Arg Thr Phe Ala Ser Glu Val Thr Arg Val Ala Arg Asp Val
340 345 350

Gly Thr Glu Gly Met Leu Gly Gly Gln Ala Asp Val Glu Gly Val Lys 355 360 365

Gly Met Trp Asn Glu Leu Thr Val Asn Val Asn Ala Met Ala Asn Asn 370 375 380

Leu Thr Thr Gln Val Arg Asp Ile Ile Asn Val Thr Thr Ala Val Ala 385 390 395 400

Lys Gly Asp Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Glu Cys Arg Gly Glu Ile
405 410 415

Phe Glu Leu Lys Asn Thr Ile Asn Ser Met Val Asp Gln Leu Gln Gln
420 425 430

Phe Ala Arg Glu Val Thr Lys Ile Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly
435 440 445

Arg Leu Gly Gln Ala Thr Val His Asp Val Gln Gly Thr Trp Arg
450 455 460

Asp Leu Thr Glu Asn Val Asn Gly Met Ala Met Asn Leu Thr Thr Gln 465 470 475 480

Val Arg Glu Ile Ala Asn Val Thr Ser Ala Val Ala Ala Gly Asp Leu
485 490 495

Ser Lys Lys Ile Arg Val Glu Val Lys Gly Glu Ile Leu Asp Leu Lys
500 505 510

Asn Thr Ile Asn Thr Met Val Asp Arg Leu Gly Thr Phe Ala Phe Glu 515 520 525

Val Ser Lys Val Ala Arg Ala Val Gly Thr Asp Gly Thr Leu Gly Gly 530 535 540

Gln Ala Gln Val Glu Asn Val Glu Gly Lys Trp Lys Asp Leu Thr Glu
545 550 555 560

Asn Val Asn Thr Met Ala Ser Asn Leu Thr Ser Gln Val Arg Gly Ile
565 570 575

Ser Thr Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Gly Asp Met Ser Arg Lys Ile 580 585 590

Asp Val Glu Ala Lys Gly Glu Ile Leu Ile Leu Lys Glu Thr Ile Asn 595 600 605

Asn Met Val Asp Arg Leu Ser Ile Phe Cys Asn Glu Val Gln Arg Val 610 615 620

Ala Lys Asp Val Gly Val Asp Gly Ile Met Gly Gly Gln Ala Asp Val 625 630 635 640

Ala Gly Leu Lys Gly Arg Trp Lys Glu Ile Thr Thr Asp Val Asn Thr
645 650 655

Met Ala Asn Asn Leu Thr Ala Gln Val Arg Ala Phe Gly Asp Ile Thr
660 665 670

Asn Ala Ala Thr Asp Gly Asp Phe Thr Lys Leu Val Glu Val Glu Ala
675 680 685

Ser Gly Glu Met Asp Glu Leu Lys Arg Lys Ile Asn Gln Met Val Tyr 690 695 700

Asn Leu Arg Asp Ser Ile Gln Arg Asn Thr Gln Ala Arg Glu Ala Ala 705 710 715 720

Glu Leu Ala Asn Lys Thr Lys Ser Glu Phe Leu Ala Asn Met Ser His
725 730 735

Glu Ile Arg Thr Pro Met Asn Gly Ile Ile Gly Met Thr Gln Leu Thr
740 745 750

Leu Asp Thr Asp Leu Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Met Leu Asn Ile Val
755 760 765

Asn Asn Leu Ala Met Ser Leu Leu Thr Ile Ile Asp Asp Ile Leu Asp
770 775 780

Leu Ser Lys Ile Glu Ala Lys Arg Met Val Ile Glu Glu Ile Pro Tyr 785 790 795 800

Thr Leu Arg Gly Thr Val Phe Asn Ala Leu Lys Thr Leu Ala Val Lys
805 810 815

Ala Asn Asp Lys Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Val Asp Ser Ser Val
820 825 830

Pro Asp His Val Ile Gly Asp Ser Phe Arg Leu Arg Gln Ile Ile Leu 835 840 845

Asn Leu Val Gly Asn Ala Ile Lys Phe Thr Glu His Gly Glu Val Ser 850 855 860

Leu Thr Ile Gln Lys Gly Asn Asp Val Thr Cys Leu Pro Asn Glu Tyr 865 870 875 880

Met Ile Glu Phe Val Val Ser Asp Thr Gly Ile Gly Ile Pro Thr Asp 885 890 895

Lys Leu Gly Leu Ile Phe Asp Thr Phe Gln Gln Ala Asp Gly Ser Met
900 905 910

Thr Arg Lys Phe Gly Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Lys Arg
915 920 925

Leu Val Asn Leu Met Gly Gly Asp Val Trp Val Lys Ser Gln Tyr Gly
930 935 940

Lys Gly Ser Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Arg Val Arg Leu Ala Asp Val 945 950 955 960

Asp Ile Ser Leu Ile Arg Lys Gln Leu Lys Pro Tyr Lys Gly His Gln
965 970 975

Val Leu Phe Ile Asp Lys Gly Lys Thr Gly His Gly Pro Glu Val Gly
980 985 990

Gln Met Leu Gly Gln Leu Gly Leu Val Pro Ile Val Leu Glu Ser Glu
995 1000 1005

Gln Asn His Thr Leu Thr Arg Val Arg Gly Lys Glu Cys Pro Tyr 1010 1015 1020

- Asp Val Ile Val Val Asp Ser Ile Asp Thr Ala Arg Arg Leu Arg
  1025 1030 1035
- Gly Ile Asp Asp Phe Lys Tyr Leu Pro Ile Val Leu Leu Ala Pro 1040 1045 1050
- Thr Val His Val Ser Leu Lys Ser Cys Leu Asp Leu Gly Ile Thr 1055 1060 1065
- Ser Tyr Met Thr Met Pro Cys Lys Leu Ile Asp Leu Gly Asn Gly
  1070 1075 1080
- Met Val Pro Ala Leu Glu Asn Arg Ala Thr Pro Ser Leu Ser Asp 1085 1090 1095
- Asn Thr Lys Ser Phe Glu Ile Leu Leu Ala Glu Asp Asn Thr Val
  1100 1105 1110
- Asn Gln Arg Leu Ala Val Lys Ile Leu Glu Lys Tyr Asn His Val
  1115 1120 1125
- Val Thr Val Val Ser Asn Gly Ala Glu Ala Leu Glu Ala Val Lys
  1130 1135 1140
- Asp Asn Lys Tyr Asp Val Ile Leu Met Asp Val Gln Met Pro Val
  1145 1150 1155

Met Gly Gly Phe Glu Ala Thr Ala Lys Ile Arg Glu Tyr Glu Arg 1160 1165 1170

- Ser Leu Gly Thr Gln Arg Thr Pro Ile Ile Ala Leu Thr Ala His 1175 1180 1185
- Ala Met Met Gly Asp Arg Glu Lys Cys Ile Glu Ala Gln Met Asp 1190 1195 1200
- Glu Tyr Leu Ser Lys Pro Leu Gln Gln Asn His Leu Ile Gln Thr 1205 1210 1215
- Ile Leu Lys Cys Ala Thr Leu Gly Gly Ala Leu Leu Glu Gln Asn 1220 1225 1230
- Arg Glu Arg Glu Leu Glu Leu Ala Arg His Ala Glu His Lys Gly
  1235 1240 1245
- Gly Leu Ser Thr Asp Pro Ala Arg Ala Ser Ser Val Met Arg Pro 1250 1255 1260
- Pro Leu His His Arg Pro Val Thr Thr Ala Glu Ser Leu Ser Gly
  1265 1270 1275
- Gly Ala Glu Ser Pro Ser Leu Met Ala Asn Asp Gly Glu Asp Pro 1280 1285 1290
- Ile Gln Arg Ala Arg Ser Ser Leu Ser Glu Pro Gly Cys Leu 1295 1300 1305

<210> 17

<211> 1298

<212> PRT

<213> Neurospora crassa

<400> 17

Met Thr Asp Gly Pro Thr Leu Ala Ala Ile Ala Ala Leu Val Lys Ser 1 5 10 15

Leu Ala Val Asp Pro Ala Thr Thr Gln Thr Ser Gly Leu Arg Pro Ser
20 25 30

Thr His Val Arg Leu Pro Gly Pro Tyr Thr Arg Glu Lys Gly Asp Leu 35 40 45

Glu Arg Glu Leu Ser Ala Leu Val Val Arg Ile Glu Gln Leu Glu Thr
50 55 60

Ala Ala Ile Ala Ala Ser Pro Pro Ala Met Pro Asp Thr Pro Asn Ala 65 70 75 80

Pro Thr Asp Ala Leu Phe Ser Asn Gly Thr Leu Ser Pro Ser Ser Glu
85 90 95

Thr Pro Asp Ala Arg Tyr Pro Ala Pro Leu Pro Arg Asn Gly Phe Ile
100 105 110

Asp Glu Ala Leu Glu Gly Leu Arg Glu His Val Asp Asp Gln Ser Lys

115 120 125

Leu Leu Asp Ser Gln Arg Gln Glu Leu Ala Gly Val Asn Ala Gln Leu
130 135 140

Ile Glu Gln Lys Gln Leu Gln Glu Lys Ala Leu Ala Ile Ile Glu Gln 145 150 155 160

Glu Arg Val Ala Thr Leu Glu Arg Glu Leu Trp Lys His Gln Lys Ala 165 170 175

Asn Glu Ala Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile Gly Glu Ile Val Thr
180 185 190

Ala Val Ala Arg Gly Asp Leu Ser Lys Lys Val Arg Met Asn Ser Val
195 200 205

Glu Met Asp Pro Glu Ile Thr Thr Phe Lys Arg Thr Ile Asn Thr Met
210 215 220

Met Asp Gln Leu Gln Val Phe Ser Ser Glu Val Ser Arg Val Ala Arg 225 230 235 240

Glu Val Gly Thr Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Gln Ile Glu Gly
245 250 255

Val Asp Gly Thr Trp Lys Glu Leu Thr Asp Asn Val Asn Val Met Ala
260 265 270

Gln Asn Leu Thr Asp Gln Val Arg Glu Ile Ala Ser Val Thr Thr Ala 275 280 285

Val Ala His Gly Asp Leu Thr Lys Lys Ile Glu Arg Pro Ala Lys Gly
290 295 300

Glu Ile Leu Gln Leu Gln Gln Thr Ile Asn Thr Met Val Asp Gln Leu 305 310 315 320

Arg Thr Phe Ala Ser Glu Val Thr Arg Val Ala Arg Asp Val Gly Thr
325
330
335

Glu Gly Ile Leu Gly Gly Gln Ala Asp Val Glu Gly Val Gln Gly Met

340 345 350

Trp Asn Glu Leu Thr Val Asn Val Asn Ala Met Ala Asn Asn Leu Thr
355 360 365

Thr Gln Val Arg Asp Ile Ile Lys Val Thr Thr Ala Val Ala Lys Gly 370 375 380

Asp Leu Thr Gln Lys Val Gln Ala Glu Cys Arg Gly Glu Ile Phe Glu 385 390 395 400

Leu Lys Lys Thr Ile Asn Ser Met Val Asp Gln Leu Gln Gln Phe Ala
405 410 415

Arg Glu Val Thr Lys Ile Ala Arg Glu Val Gly Thr Glu Gly Arg Leu
420 425 430

Gly Gly Gln Ala Thr Val His Asp Val Gln Gly Thr Trp Arg Asp Leu
435 440 445

Thr Glu Asn Val Asn Gly Met Ala Met Asn Leu Thr Thr Gln Val Arg
450 455 460

Glu Ile Ala Lys Val Thr Thr Ala Val Ala Lys Gly Asp Leu Thr Lys
465 470 475 480

Lys Ile Gly Val Glu Val Gln Gly Glu Ile Leu Asp Leu Lys Asn Thr
485 490 495

Ile Asn Thr Met Val Asp Arg Leu Gly Thr Phe Ala Phe Glu Val Ser 500 505 510

Lys Val Ala Arg Glu Val Gly Thr Asp Gly Thr Leu Gly Gly Gln Ala
515 520 525

Gln Val Asp Asn Val Glu Gly Lys Trp Lys Asp Leu Thr Glu Asn Val
530 535 540

Asn Thr Met Ala Ser Asn Leu Thr Ser Gln Val Arg Gly Ile Ser Thr 545 550 555 560

Val Thr Gln Ala Ile Ala Asn Gly Asp Met Ser Arg Lys Ile Glu Val
565 570 575

Glu Ala Lys Gly Glu Ile Leu Ile Leu Lys Glu Thr Ile Asn Asn Met
580 585 590

Val Asp Arg Leu Ser Ile Phe Cys Asn Glu Val Gln Arg Val Ala Lys
595 600 605

Asp Val Gly Val Asp Gly Ile Met Gly Gly Gln Ala Asp Val Ala Gly 610 615 620

Leu Lys Gly Arg Trp Lys Glu Ile Thr Thr Asp Val Asn Thr Met Ala 625 630 635 640

Asn Asn Leu Thr Ala Gln Val Arg Ala Phe Gly Asp Ile Thr Asn Ala 645 650 655

Ala Thr Asp Gly Asp Phe Thr Lys Leu Val Glu Val Glu Ala Ser Gly 660 665 670

Glu Met Asp Glu Leu Lys Lys Ile Asn Gln Met Val Tyr Asn Leu 675 680 685

Arg Asp Ser Ile Gln Arg Asn Thr Gln Ala Arg Glu Ala Ala Glu Leu 690 695 700

Ala Asn Lys Thr Lys Ser Glu Phe Leu Ala Asn Met Ser His Glu Ile
705 710 715 720

Arg Thr Pro Met Asn Gly Ile Ile Gly Met Thr Gln Leu Thr Leu Asp
725 730 735

Thr Asp Leu Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Met Leu Asn Ile Val Asn Ser
740 745 750

Leu Ala Asn Ser Leu Leu Thr Ile Ile Asp Asp Ile Leu Asp Leu Ser
755 760 765

Lys Ile Glu Ala Arg Arg Met Val Ile Glu Glu Ile Pro Tyr Thr Leu
770 775 780

Arg Gly Thr Val Phe Asn Ala Leu Lys Thr Leu Ala Val Lys Glu Thr
785 790 795 800

Glu Lys Phe Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Val Asp His Ser Val Pro Asp

805

810

815

His Val Val Gly Asp Ser Phe Arg Leu Arg Gln Ile Ile Leu Asn Leu 820 825 830

Val Gly Asn Ala Ile Lys Phe Thr Glu His Gly Glu Val Ser Leu Thr
835 840 845

Ile Gln Lys Ala Ser Ser Val Gln Cys Ser Thr Glu Glu Tyr Ala Ile 850 855 860

Glu Phe Val Val Ser Asp Thr Gly Ile Gly Ile Pro Ala Asp Lys Leu 865 870 875 880

Asp Leu Ile Phe Asp Thr Phe Gln Gln Ala Asp Gly Ser Met Thr Arg
885 890 895

Lys Phe Gly Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Lys Arg Leu Val
900 905 910

Asn Leu Met Gly Gly Asp Val Trp Val Lys Ser Glu Tyr Gly Lys Gly
915 920 925

Ser Lys Phe Phe Phe Thr Cys Val Val Arg Leu Ala Asn Asp Asp Ile 930 935 940

Ser Leu Ile Ala Lys Gln Leu Asn Pro Tyr Lys Ser His Gln Val Leu 945 950 955 960

Phe Ile Asp Lys Gly Arg Thr Gly His Gly Pro Glu Ile Ala Lys Met
965 970 975

Leu His Gly Leu Gly Leu Val Pro Ile Val Val Asp Ser Glu Arg Asn 980 985 990

Pro Ala Leu Glu Lys Ala Arg Ala Ala Gly Gln Ala Pro Tyr Asp Val 995 1000 1005

Ile Ile Val Asp Ser Ile Glu Asp Ala Arg Arg Leu Arg Ser Val Asp 1010 1015 1020

Asp Phe Lys Tyr Leu Pro Ile Val Leu Leu Ala Pro Val Val His Val 1025 1030 1035 1040

Ser Leu Lys Ser Cys Leu Asp Leu Gly Ile Thr Ser Tyr Met Thr Thr

1045 1050 1055

Pro Cys Gln Leu Ile Asp Leu Gly Asn Gly Met Val Pro Ala Leu Glu 1060 1065 1070

Asn Arg Ala Thr Pro Ser Leu Ala Asp Asn Thr Lys Ser Phe Glu Ile 1075 1080 1085

Leu Leu Ala Glu Asp Asn Thr Val Asn Gln Arg Leu Ala Val Lys Ile 1090 1095 1100

Leu Glu Lys Tyr His His Val Val Thr Val Val Gly Asn Gly Glu Glu
1105 1110 1115 1120

Ala Val Glu Ala Val Lys Arg Lys Lys Phe Asp Val Ile Leu Met Asp 1125 1130 1135

Val Gln Met Pro Ile Met Gly Gly Phe Glu Ala Thr Ala Lys Ile Arg

1140 1145 1150

Glu Tyr Glu Arg Ser Leu Gly Ser Gln Arg Thr Pro Ile Ile Ala Leu 1155 1160 1165

Thr Ala His Ala Met Met Gly Asp Arg Glu Lys Cys Ile Gln Ala Gln
1170 1175 1180

Met Asp Glu Tyr Leu Ser Lys Pro Leu Gln Gln Asn His Leu Ile Gln 1185 1190 1195 1200

Thr Ile Leu Lys Cys Ala Thr Leu Gly Gly Gln Leu Leu Glu Lys Asn 1205 1210 1215

Arg Glu Arg Glu Leu Thr Arg Ala Ala Asp Ala Val Thr Gly Gly Arg 1220 1225 1230

Arg Asp Asn Gly Met Tyr Ser Ala Ser Gln Ala Ala Gln His Ala Ala 1235 1240 1245

26/27

Leu Arg Pro Pro Leu Ala Thr Arg Gly Leu Thr Ala Ala Asp Ser Leu 1250 1255 1260

Val Ser Gly Leu Glu Ser Pro Ser Ile Val Thr Ala Asp Lys Glu Asp 1265 1270 1275 1280

Pro Leu Ser Arg Ala Arg Ala Ser Leu Ser Glu Pro Asn Ile His Lys 1285 1290 1295

Ala Ser

## SINTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004272

	CATION OF SUBJECT MATTER C12N1/19, 15/54, C12Q1/18, GC	1N33/15, 33/50		
According to Inte	According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SE				
	nentation searched (classification system followed by classification syste			
Jitsuyo Kokai Ji	tsuyo Shinan Koho 1971-2005 To	tsuyo Shinan Toroku Koho roku Jitsuyo Shinan Koho	1996-2005 1994-2005	
	ase consulted during the international search (name of d (STN), JICST FILE(JOIS), BIOSIS		erms used)	
C. DOCUMEN	ITS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where ap		Relevant to claim No.	
Y	OCHIAI, N. et al., "Character mutations in the two-componen kinase gene that confer fludi resistance and osmotic sensit the os-1 mutants of Neurospor Pest.Manag.Sci., 2001, Vol.57 p.437-42	t histidine oxonil ivity in a crassa.",	1-11	
Y	M. OSHIMA et al., "A Point Mu Component Histidine Kinase Bo Dicarboximide Resistance in F Botrytis cinerea.", PHYTOPATH Vol.92, No.1, pages 75 to 80	OS-1 Gene Confers Tield Isolates of	1-11	
× Further do	cuments are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.		
"A" document d to be of part	gories of cited documents: efining the general state of the art which is not considered icular relevance cation or patent but published on or after the international	"T" later document published after the inte date and not in conflict with the applica- the principle or theory underlying the in "X" document of particular relevance; the considered novel or cannot be consid-	ntion but cited to understand nvention laimed invention cannot be	
"L" document w	which may throw doubts on priority claim(s) or which is ablish the publication date of another citation or other on (as specified)	step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the c	laimed invention cannot be	
"O" document re "P" document pu priority date	ferring to an oral disclosure, use, exhibition or other means ablished prior to the international filing date but later than the claimed	considered to involve an inventive scombined with one or more other such being obvious to a person skilled in the "&" document member of the same patent f	documents, such combination art amily	
07 Apri	l completion of the international search	Date of mailing of the international sear 26 April, 2005 (26	ch report . 04 . 05)	
	ng address of the ISA/ se Patent Office	Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/004272

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	N. OCHIAI et al., "Effects of Iprodione and Fludioxonil on Glycerol Synthesis and Hyphal Development in Candida albicans", Biosci. Biotechnol.Biochem., 2002, Vol.66, No.10, pages 2209 to 2215	1-11
Y	WO 98/044148 A1 (MYCOTOX, INC.), 08 October, 1998 (08.10.98), Full description & AU 6770398 A	1-11
Y	YOSHIMI A. et al., "Cloning and characterization of the histidine kinase gene Dic1 from Cochliobolus heterostrophus that confers dicarboximide resistance and osmotic adaptation.", Mol.Genet Genomics., Epub 30 January, 2004 (30.01.04), Vol.271, No.2, p.228-36.	1-11
Y	Takayuki MOTOYAMA et al., "Ineimochibyokin no Histidine Kinase o Kaishita Joho Dentatsukei no Kaiseki", Nippon Nogei Kagakukai 2002 Nendo (Heisei 14 Nendo) Taikai Koen Yoshishu, 05 March, 2002 (05.03.02) Hakko, page 187, 3-5Dp16	1-11
Y	Makoto FUJIMURA, "Shijokin no Histidine Kinase Signal Dentatsu to Yakuzai Taisei", Nippon Noyaku Gakkaishi, 2003, Vol.28, No.4, pages 484 to 488	1-11
Y	JP 8-507441 A (THE SALK INSTITUTE BIOTECHNOLOGY/INDUSTRIAL ASSOCIATES, INC.), 13 August, 1996 (13.08.96), Claims 27, 28 & US 5837489 A1 & EP 688361 A & WO 94/20617 A2	1-11
P,X	EP 1415996 A2 (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 06 May, 2004 (06.05.04), & US 2004/013759 A	1-11
P,X	Takayuki MOTOYAMA et al., "Shijokin Yurai Histidine Kinase no Hatsugen ni yoru, Shijokin Tokuiteki Noyaku Kanjusei no Shutsuga Kobo no Sakusei", Nippon Nogei Kagakukai 2004 Nendo (Heisei 16 Nendo) Taikai Koen Yoshishu, 05 March, 2004 (05.03.04) Hakko, page 21, 2A06a08	1-11

#### 国際調查報告

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC)) Int.Cl.<sup>7</sup> C12N1/19, 15/54, C12Q1/18, G01N33/15, 33/50

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N1/19, 15/54, C12Q1/18, G01N33/15, 33/50

#### 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報

1922-1996年

日本国公開実用新案公報

1971-2005年

日本国実用新案登録公報

1996-2005年

日本国登録実用新案公報

1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), JICST ファイル (JOIS), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

#### C. 関連すると認められる文献

引用文献の		関連する
カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	OCHIAI N.,et.al.,"Characterization of mutations in the two-component	1-11
	histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic	:
	sensitivity in the os-1 mutants of Neurospora crassa."	
	Pest Manag Sci. ,2001, Vol. 57, No. 5, p. 437-42	
•		,
Y	M.OSHIMA,et.al.,"A Point Mutation in the Two-Component Histidine	1–11
	Kinase BcOS-1 Gene Confers Dicarboximide Resistance in Field Isolates of	
	Botrytis cinerea."PHYTOPATHOLOGY,2002,Vol.92,No.1,p.75-80	

## ▼ C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

#### \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す もの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日 以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 日若しくは他の特別な理由を確立するために引用す る文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

#### の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって 出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論 の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明 の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以 上の文献との、当業者にとって自明である組合せに よって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

### 国際調査を完了した日

07.04.2005

# 国際調査報告の発送日26. 4. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 特許庁審査官(権限のある職員)

4 N

9739

田中 晴絵

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	N.OCHIAI,et.al.,"Effects of Iprodione and Fludioxonil on Glycerol Synthesis and Hyphal Development in Candida albicans"	1–11
,	Biosci.Biotechnol.Biochem.,2002,Vol.66,No.10,p.2209-2215	,
Y	WO 98/044148 A1(MYCOTOX,INC.)1998.10.08,明細書全体 & AU 6770398 A	1–11
Y	YOSHIMI A.,et.al.,"Cloning and characterization of the histidine kinase gene Dic1 from Cochliobolus heterostrophus that confers dicarboximide	1-11
	resistance and osmotic adaptation."  Mol Genet Genomics. ,Epub 2004 Jan 30,Vol.271,No.2,p.228-36.	
Υ .	本山高幸他, "イネいもち病菌のヒスチジンキナーゼを介した情報伝達系の解析",日本農芸化学会2002年度(平成14年度)大会講演要旨集,2002年3月5日発行, p.187,3-5Dp16	1-11
Y	藤村真, "糸状菌のヒスチジンキナーゼシグナル伝達と薬剤耐性 " ,日本農薬学会誌,2003,Vol.28,No.4,p.484-488	1–11
Y	JP 8-507441 A(ザ ソールク インステチュート バイオテクノロジー/インダストリアル アソシエイツ 、インコーポレイテッド)1996.08.13,請求項 27,28 等 & US 5837489 A1 & EP 688361 A & WO 94/20617 A2	1–11
РХ	EP 1415996 A2 (Sumitomo Chemical Company,Limited)2004.05.06 & US 2004/013759 A	1–11
РХ	本山高幸他, "糸状菌由来ヒスチジンキナーゼの発言による、糸状菌特異的農 薬感受性の出芽酵母の作成",日本農芸化学会2004年度(平成16年度) 大会講演要旨集,2004年3月5日発行, p.21,2A06a08	1-11